

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität in Gießen
Direktoren: Prof. Dr. med. H. J. Dengler
und Prof. Dr. med. H.-G. Lasch

**Ein Beitrag zur Herkunft und Funktion
lymphatischer Zellen mit alkalischer
Phosphatase-Aktivität von Albinomäusen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität in Gießen

vorgelegt von
Walter Kurt Kuhlmann

Gießen 1972

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität in Gießen
Direktoren: Prof. Dr. med. H. J. Dengler
und Prof. Dr. med. H.-G. Lasch

Ein Beitrag zur Herkunft und Funktion lymphatischer Zellen mit alkalischer Phosphatase-Aktivität von Albinomäusen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität in Gießen

vorgelegt von
Walter Kurt Kuhlmann

Gießen 1972

Dekan: Prof. Dr. med. Hj. Staudinger

Referent: Prof. Dr. med. H. Löffler

Korreferent: Prof. Dr. Ebner



Für die Stellung des Themas und die Beratung
während der Ausarbeitung bin ich Herrn
Prof. Dr. H. Löffler zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. J. Dudeck und seinen Mitarbeitern
danke ich für die Beratung bei der statistischen
Auswertung.

Inhaltsübersicht

	Seite
1.1 Einleitung	2
1.2 Fragestellung	6
2. Versuchstiere und Material	
2.1 Tiere	7
2.2 PHA-P	7
2.3 Dexamethason	7
3.1 Versuchsaufbau	8
4. Methoden	
4.1 Milztupfpräparate	9
4.2 Milzgefrierschnitte	11
4.3 Milzparaffinschnitte	12
5. Ergebnisse	
5.1 prozentuale Verteilung der peripheren Blutzellen vor Beginn und am Ende des Versuches	12
5.2 Milztupfpräparate	20
Abbildungen zu den Milztupfpräparaten	26
5.3 Milzgefrierschnitte	29
5.4 Milzparaffinschnitte	35
6. Diskussion	37
7. Zusammenfassung	39
8. Literaturangaben	41

Ein Beitrag zur Herkunft und Funktion lymphatischer Zellen mit alkalischer Phosphatase-Aktivität von Albinomäusen

1.1 Einleitung

Die Lymphozyten sind eine heterogene Zellpopulation mit verschiedenen Funktionen. Nach einer Zusammenstellung von DANIELS, RITZMANN und LEVIN (1) nehmen die Lymphozyten einmal an der zellulären Abwehr bei Sensitivität, Transplantationen und Autoimmunreaktionen teil, zum anderen bewahren sie ein immunologisches Gedächtnis von einer ersten zu folgenden Immunreaktionen im Rahmen der humoralen Verteidigungsreaktion.

Schließlich haben Lymphozyten eine große prospektive Potenz. Sie können sich in große, pyroninophile Blasten umwandeln, die wiederum in der Lage sind, sich in andere Zelltypen zu differenzieren, möglicherweise in Plasmazellen, oder auch kleine Lymphozyten zu produzieren.

Aus in-vivo-Versuchen mit radioaktiv markierten Lymphozyten (2) ist bekannt, daß es eine kurzlebige Population gibt, die nur wenige Tage lang existiert, und eine langlebige Population von Lymphozyten, die eine Überlebensdauer von 80 - 90 Tagen aufweist.

GRUNDMANN (3) hat beim Menschen zwei morphologisch verschiedene Gruppen von Lymphozyten unterschieden und sie als makronukleoläre und polynukleoläre Lymphozyten bezeichnet. Die ersteren finden sich überwiegend in den Follikeln von Lymphknoten und Milz, die letzteren an den Sinus. Im peripheren Blut kommen makronukleoläre und polynukleoläre Formen etwa im Verhältnis von 4 : 1 vor. Die beiden Gruppen lassen sich in Blutaussstrichen nach den Angaben von STOCKINGER und KELLNER mit Methylenblau gefärbt gut ausdifferenzieren. Dem quantitativen Verhältnis soll eine gewisse diagnostische Bedeutung zukommen, die noch zu erhöhen sein soll, wenn die oben genannte Färbung mit der PAS-Reaktion kombiniert wird. Normalerweise findet man bei den polynukleolären Lymphozyten in jeder dritten Zelle PAS-positives Material, bei den makronukleolären dagegen nur etwa in jeder achten Zelle. Im Verlaufe von Infektionskrankheiten, beim Lymphosarkom oder einigen anderen Erkrankungen nimmt die Zahl der polynukleolären Lymphozyten mit PAS-positiven Einschlüssen zu, bei der chronischen lymphatischen Leukämie dagegen wird eine sehr starke Zunahme der makronukleolären Formen und der PAS-positiven Substanzen in diesen Zellen beobachtet.

Eine andere Differenzierung der Lymphozyten nach morphologischen und strukturellen Gesichtspunkten empfiehlt zum Beispiel LENNERT (4).

1. kleine Lymphozyten

Sie sind etwa 6 - 10 μ im Durchmesser groß und haben im gefärbten Ausstrich einen sehr dunklen

Kern mit verklumptem Chromatingerüst. Ein Nukleolus ist gewöhnlich nicht sichtbar. Das Zytoplasma bildet einen schmalen Saum um den Kern, es ist schwach basophil. In Schnittpräparaten läßt sich aber meist doch ein Nukleolus nachweisen.

2. große Lymphozyten

Sie haben eine Größe von 10 - 20 μ im Durchmesser. Im gefärbten Ausstrich haben sie einen weniger dichten Kern als die kleinen Lymphozyten, das Chromatingerüst ist lockerer. Das Zytoplasma ist breiter und ebenfalls schwach basophil. Sowohl bei großen als auch bei kleinen Lymphozyten kommen teilweise azurophile Granula im Zytoplasma vor.

3. Lymphoblasten

Sie messen etwa 10 - 20 μ im Durchmesser. Die Zellkerne sind hell gefärbt, das Chromatingerüst ist fein. Lymphoblasten haben etwa die gleiche Kern-Plasma-Relation wie große Lymphozyten. Das Zytoplasma ist stärker bis tief basophil.

Diese morphologische Differenzierung wurde wegen ihrer einfachen Anwendbarkeit auf die zu untersuchenden Mäuselymphozyten in dieser Arbeit anderen, zum Teil wesentlich komplizierteren Differenzierungsmöglichkeiten vorgezogen.

KAPLOW (5) untersuchte bei verschiedenen Säugetieren und beim Menschen periphere Blutzellen auf das Vor-
kommen von alkalischer Phosphatase-Aktivität. Dabei
wies er nach, daß bei einigen Arten auch Aktivität in
Lymphozyten vorkommt.

FISCHER und SCHAEFER fanden sogar Unterschiede bei ver-
schiedenen Muridenarten (6).

Tabellé 1

Anwesenheit von alkalischer Phosphatase-Aktivität im
Zytoplasma peripherer Blutlymphozyten

Art	Lymphozyten mit alk. Phosphatase
Albinomaus	3,0 - 8,5 % im Mittel 5,8 %
Meerschweinchen	0,5 - 3,5 % im Mittel 1,5 %
Mensch	0,0 - 1,5 % im Mittel 0,39 %
Kaninchen, Hamster, Ratte	0,0 %

(aus Kaplow, L.S., Alkaline phosphatase activity in peri-
pheral blood lymphocytes. Arch.Path. 88, 69 - 72 (1969))

Damit ergab sich eine neue Möglichkeit, Lymphozyten
zytochemisch in zwei Gruppen zu unterteilen, nämlich in
solche mit alkalischer Phosphatase-Aktivität und in andere,
die keine solche Reaktion zeigen.

1.2 Fragestellung

In der Arbeit sollte untersucht werden, wo die Lymphozyten mit alkalischer Phosphatase-Aktivität gebildet werden und ob sich Lymphozyten mit und ohne alkalische Phosphatase-Aktivität auch funktionell unterscheiden.

Dazu wurde bei Mäusen in-vivo mit Bacto-Phytohemagglutinin-P eine Stimulation des lymphatischen Gewebes hervorgerufen, die als Modell einer Antigeneinschwemmung mit der entsprechenden Reaktion des lymphatischen Systems anzusehen ist.

Diese Reaktion wurde bei einer Gruppe von Versuchstieren mit Dexamethason gehemmt.

Die Milzlymphozyten wurden bei unbehandelten Tieren, bei solchen, die PHA-P erhalten hatten und schließlich bei solchen, die PHA-P und Dexamethason verabreicht bekamen, auf ihren Gehalt an alkalischer Phosphatase-Aktivität im Zytoplasma untersucht und verglichen.

2. Versuchstiere und Material

2.1 Tiere

Für die Untersuchungen wurden ausnahmslos junge, männliche Albinomäuse aus dem gleichen Inzuchtsstamm mit einem Körpergewicht von 35 - 40 g verwendet.

2.2 PHA-P

Bacto-Phytohemagglutinin-P (Firma Difco, Detroit, Code 3110) ist ein steriles, getrocknetes Protein-Phytohemagglutinin ohne Polysaccharidanteil, das nicht toxisch wirkt. Es wird in sterilem, destilliertem Wasser aufgelöst.

Phytohemagglutinine eignen sich ausgezeichnet zur Isolierung von Leukozyten aus Vollblut und werden daher vorzugsweise zur Herstellung von Leukozytenkulturen benutzt (7).

Außerdem haben Phytohemagglutinine die Eigenschaft, eine Transformation von Lymphozyten in „Blasten“ hervorzurufen und zwar in-vivo wie in-vitro (8).

2.3 Dexamethason

Als Präparat wurde Fortecortin^R der Firma Merck gewählt, das 4 mg Dexamethason in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung enthält.

3.1 Versuchsaufbau

Es wurden vier Gruppen von Versuchstieren gebildet:

- Gruppe A: 5 Tiere, die je 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal erhielten
- Gruppe B: 5 Tiere, die je 0,1 ml PHA-P-Lösung intraperitoneal erhielten
- Gruppe C: 5 Tiere, die je 0,2 ml PHA-P-Lösung intraperitoneal erhielten
- Gruppe D: 10 Tiere, denen jeweils gleichzeitig 0,2 ml PHA-P-Lösung intraperitoneal und 0,4 mg Dexamethason subkutan verabreicht wurden.

Zu Beginn des Versuches wurde allen Tieren Blut aus der Schwanzvene entnommen und Ausstriche davon angefertigt, die nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt wurden.

Sofort nach der Blutentnahme erhielten die Tiere ihre Injektionen.

Nach jeweils 48 Stunden wurden von jedem Tier erneut Blutaussstriche hergestellt. Das Auftreten von Blasten im peripheren Blut diente als Kontrolle für die Wirksamkeit von PHA-P.

Unmittelbar danach wurden die Mäuse durch Ätherinhalation getötet und ihnen die Milzen entnommen. Von den frischen Milzschnittflächen wurden Tupfpräparate abgenommen. Die Hälfte jeder Milz wurde dann eingefroren, die andere Hälfte zu Paraffinschnitten weiterverarbeitet.

4. Methoden

4.1 Milztupfpräparate

Von den frischen Schnittflächen der Milzen wurden mit entfetteten Objektträgern Abstriche entnommen, die zwei Stunden an der Luft getrocknet wurden. Der Nachweis der Aktivität alkalischer Phosphatase wurde nach der Methode von MERKER und HEILMEYER durchgeführt (9):

- a) 30 Sekunden lang Fixieren der Präparate in einem Gemisch aus 90 Teilen Methanol (100 %ig) und 10 Teilen Formalin (37 %ig) bei einer Temperatur von + 4° C
- b) Spülen in fließendem Wasser
- c) Inkubation für eine Stunde bei + 4° C in folgender, immer frisch anzusetzender Substratlösung:

70 ml 2 %iges Veronalnatrium

35 mg Natrium-alpha-Naphthylphosphat

70 mg Variaminblausalz B conc.

Einstellung der Lösung auf einen pH-Wert von 9,4

- d) Spülen in fließendem Wasser, Lufttrocknen
 - e) Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun
 - f) Eindecken der noch feuchten Präparate in Gela-
- tinol

Beurteilung der Milztupfpräparate

Die Präparate wurden mit dem 100 fachen Objektiv (Ölimmersion) untersucht.

Dabei wurden pro Präparat 500 Lymphozyten ausgezählt und der Anteil der Lymphozyten mit Aktivität von alkalischer Phosphatase im Zytoplasma prozentual festgestellt. Zur Abschätzung der Aktivität wurde eine Einteilung in sechs Reaktionsklassen benutzt:

Reaktionsklasse 0: keine Reaktion

Reaktionsklasse 1: einzelne Farbstoffkörnchen im Zytoplasma

Reaktionsklasse 2: zunehmende, inhomogene Farbniederschläge

Reaktionsklasse 3: diffuse Verteilung der meist granulären Ablagerungen in der gesamten Zelle, deren Zytoplasma jedoch noch transparent ist

Reaktionsklasse 4: weitere Zunahme der Reaktion, schwarze Farbstoffplaques, der Zellkern ist noch abgrenzbar

Reaktionsklasse 5: Zytoplasma schwarz mit teilweiser Überdeckung des Kerns

Aus dieser Einteilung, die von BRODELL und SWISHER für die Aktivität alkalischer Phosphatase in neutrophilen Granulozyten angegeben wurde (10), läßt sich auch analog bei den Lymphozyten ein „Phosphatase-Index“ ermitteln. Dazu werden die gefundenen Prozentzahlen jeder Reaktionsgruppe mit einem entsprechenden Faktor multipliziert, nämlich die der Reaktionsklasse 1 mit dem Faktor 1, die der Reaktionsklasse 2 mit dem Faktor 2 u.s.w.,

die Summe der Einzelprodukte ergibt dann den Phosphatase-Index.

4.2 Milzgefrierschnitte

Von jeder frisch entnommenen Milz wurde sofort ein Stück bei -26°C eingefroren. Daraus wurden dann auf einem Gefriermikrotom bei Temperaturen zwischen -15 und -20°C Schnitte von $6\text{ }\mu$ Dicke hergestellt, die auf Objektträger gebracht und zwei Stunden lang bei Zimmertemperatur getrocknet wurden.

Die Aktivität alkalischer Phosphatase wurde wie folgt nachgewiesen:

- a) Inkubation der getrockneten, unfixierten Präparate für eine Stunde bei Zimmertemperatur in folgender Lösung:

40 ml 0,1 mol Tris-HCl-Puffer
10 mg Natrium-alpha-Naphthylphosphat
80 mg Echtblausalz BB

Einstellung der Lösung auf einen pH-Wert von 9,4

- b) Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun
c) Eindecken der Präparate in Gelatinol

Beurteilung der Milzgefrierschnitte

Auch diese Präparate wurden mit dem 100 fachen Objektiv mit Hilfe von Immersionsöl mikroskopisch untersucht. Dabei wurde die Verteilung der Lymphozyten mit alkalischer Phosphatase-Aktivität in den Follikeln beurteilt.

4.3 Milzparaffinschnitte

Von den frisch entnommenen Milzen wurden kleine Stücke in 4 %iger Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Die 6 μ dicken Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin, eine zweite Serie nach Giemsa gefärbt.

Diese Präparate wurden angefertigt, um feinere strukturelle Veränderungen in den Follikeln beurteilen zu können.

5. Ergebnisse

5.1 prozentuale Verteilung der peripheren Blutzellen vor Beginn und am Ende des Versuches

Gruppe A

Tabelle 2

Versuchsbeginn

Tier, Nr.	Lympho- zyten	Blasten	neutroph. Granuloz.	eosinoph. Granuloz.	basoph. Granuloz.	Mono- zyten
1	70,5	0,0	26,5	0,5	0,0	2,5
2	68,5	0,0	24,5	2,0	0,0	5,0
3	76,5	0,0	18,0	1,5	0,0	4,0
4	62,0	0,0	33,0	3,0	0,0	2,0
5	68,0	0,0	26,0	2,5	0,0	3,5

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß in keinem der Präparate Lymphoblasten gefunden wurden.

48 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung fand sich die in der Tabelle 3 aufgeführte prozentuale Verteilung von Leukozyten im peripheren Blut.

Tabelle 3

Tier, Nr.	Lympho= zyten	Blasten	neutroph. Granuloz.	eosinoph. Granuloz.	basoph. Granuloz.	Mono= zyten
1	72,0	0,0	22,0	1,0	0,0	5,0
2	70,0	0,0	23,5	3,0	0,0	3,5
3	77,0	0,0	18,0	2,0	0,0	3,0
4	59,5	0,0	35,0	3,0	0,0	2,5
5	69,5	0,5	23,0	3,0	0,0	4,0

Aus der Tabelle 3 ist zu entnehmen, daß auch 48 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung im peripheren Blut kaum Lymphoblasten zu finden waren. Unter 1000 ausgezählten Zellen befand sich ein einziger Lymphoblast.

Gruppe B

Tabelle 4

prozentuale Verteilung der Leukozyten im peripheren Blut vor der Injektion von PHA-P-Lösung

Tier, Nr.	Lymphozyten	Blasten	neutroph. Granuloz.	eosinoph. Granuloz.	basoph. Granuloz.	Monozyten
6	59,0	0,0	29,5	4,0	0,0	7,5
7	67,5	0,0	24,5	2,5	0,0	5,5
8	70,0	0,0	23,5	3,0	0,0	3,5
9	68,5	0,5	25,0	3,5	0,0	2,5
10	63,0	0,0	33,0	1,0	0,0	3,0

Auch bei dieser Gruppe von Versuchstieren kamen vor der Injektion von PHA-P-Lösung kaum Lymphoblasten im peripheren Blut vor.

Tabelle 5

48 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 0,1 ml PHA-P-Lösung

Tier, Nr.	Lymphozyten	Blasten	neutroph. Granuloz.	eosinoph. Granuloz.	basoph. Granuloz.	Monozyten
6	58,0	7,5	26,0	2,0	0,5	6,0
7	62,0	8,0	23,0	2,0	0,0	5,0
8	57,5	11,0	26,5	2,5	0,0	2,5
9	59,0	14,0	20,5	2,5	0,0	4,0
10	60,5	8,5	26,0	1,5	0,0	3,5

Wie die Tabelle 5 zeigt, ließen sich 48 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 0,1 ml PHA-P-Lösung in den Blutaussstrichen sämtlicher Tiere dieser Versuchsgruppe zahlreiche Blasten nachweisen. Der prozentuale Anteil der Blasten betrug zwischen 7,5 und 14 % der Gesamtleukozytenzahlen, im Mittel 9,80 %.

Gruppe C

Tabelle 6

prozentuale Verteilung der Leukozyten im peripheren Blut vor der Injektion der PHA-P-Lösung

Tier, Nr.	Lympho= zyten	Blasten	neutroph. Granuloz.	eosinoph. Granuloz.	basoph. Granuloz.	Mono= zyten
11	71,0	0,0	25,0	1,5	0,0	2,5
12	64,0	0,0	31,5	1,5	0,0	3,0
13	65,5	0,0	30,0	2,0	0,0	2,5
14	63,0	0,0	31,0	2,5	0,0	3,5
15	63,0	0,0	34,0	1,0	0,0	2,0

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß in den Blutaussstrichen der Tiere der Gruppe C vor der Injektion der PHA-P-Lösung keine Blasten zu finden waren.

Tabelle 7

prozentuale Verteilung der Leukozyten im peripheren Blut 48 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 0,2 ml PHA-P-Lösung

Tier, Nr.	Lympho- zyten	Blasten	neutroph. Granuloz.	eosinoph. Granuloz.	basoph. Granuloz.	mono- zyten
11	55,5	21,5	20,0	1,0	0,0	2,0
12	51,0	17,0	27,0	1,5	0,0	3,5
13	59,0	13,5	23,5	1,0	0,0	3,0
14	59,0	12,0	26,5	1,0	0,0	1,5
15	54,0	15,0	25,0	2,0	0,0	4,0

Aus der Tabelle 7 geht hervor, daß 48 Stunden nach intra- peritonealer Injektion von 0,2 ml PHA-P-Lösung bei allen Tieren dieser Versuchsgruppe viele Blasten im peripheren Blut aufgetreten waren. Der prozentuale Anteil der Blasten betrug hier zwischen 12,0 und 21,5 %, im Mittel 15,80 %.

Gruppe D

Tabelle 8

prozentuale Verteilung der Leukozyten im peripheren Blut vor der Injektion von PHA-P-Lösung und Dexamethason

Tier, Nr.	Lympho- zyten	Blasten	neutroph. Granuloz.	eosinoph. Granuloz.	basoph. Granuloz.	Mono- zyten
16	65,0	0,0	30,5	1,5	0,0	3,0
17	66,0	0,0	32,0	0,5	0,0	1,5
18	60,0	0,5	34,0	2,0	0,0	3,5
19	71,0	0,0	25,0	2,0	0,0	2,0
20	64,0	0,0	31,5	1,5	0,0	3,0
21	56,0	0,0	39,0	2,0	0,0	3,0
22	58,0	0,0	36,5	2,0	0,0	3,5
23	67,0	0,0	28,5	1,5	0,0	3,0
24	48,0	0,0	47,0	1,0	0,0	4,0
25	59,0	0,0	37,5	2,0	0,5	1,0

Auch bei den Tieren der Gruppe D fanden sich vor den Injektionen, wie aus der Tabelle 8 hervorgeht, praktisch keine Lymphoblasten im peripheren Blut. Lediglich im Ausstrich der Maus Nr. 18 wurde ein Blast gefunden.

Tabelle 9

prozentuale Verteilung der Leukozyten im peripheren Blut 48 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 0,2 ml PHA-P-Lösung und gleichzeitiger subkutaner Injektion von 0,4 mg Dexamethason

Tier, Nr.	Lympho=zyten	Blasten	neutroph. Granuloz.	eosinoph. Granuloz.	basoph. Granuloz.	Mono=zyten
16	52,0	8,5	33,5	2,5	0,0	3,5
17	62,5	4,5	27,0	2,0	0,0	4,0
18	64,0	0,0	29,5	2,5	0,0	4,0
19	61,0	0,5	32,5	2,0	0,0	4,0
20	67,5	0,0	27,5	1,5	0,0	3,5
21	50,0	0,0	42,5	3,0	0,0	4,5
22	58,0	0,0	36,5	2,0	0,0	3,5
23	64,0	7,0	25,5	1,5	0,0	2,0
24	53,5	0,0	41,5	2,0	0,0	3,0
25	64,5	0,0	31,5	1,5	0,0	2,5

Die Tabelle 9 zeigt, daß 48 Stunden nach Injektion von 0,2 ml PHA-P-Lösung und von 0,4 mg Dexamethason in den Ausstrichen, mit Ausnahme der Tiere Nr. 16, 17 und 23, nur sehr wenige Blasten zu beobachten waren.

Bei der Sektion der Mäuse Nr. 16, 17 und 23 wurden an den subkutanen Injektionsstellen große Hämatome gefunden, so daß angenommen werden mußte, daß das injizierte Dexa=

methason - wenn überhaupt - nur unvollständig resorbiert worden war. Deshalb wurden die Milzen der Tiere Nr. 16, 17 und 23 von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Auch bei der folgenden Berechnung des Mittelwertes des prozentualen Anteils von Blasten im peripheren Blut wurden die drei Tiere nicht berücksichtigt.

Einen direkten Vergleich der Mittelwerte des prozentualen Anteils von Blasten im peripheren Blut der einzelnen Versuchsgruppen vor und nach der Behandlung gestattet die folgende Tabelle.

Tabelle 10

Mittelwerte des prozentualen Anteils von Blasten im peripheren Blut

	vor Injektion	nach 48 Stunden
Gruppe A	0,00 %	0,10 %
Gruppe B	0,10 %	9,80 %
Gruppe C	0,00 %	15,80 %
Gruppe D	0,07 %	0,07 %

Zusammenfassung

Bei den unbehandelten Tieren kamen nur ganz vereinzelt Blasten im peripheren Blut vor. Die Injektion von PHA-P-Lösung in die freie Bauchhöhle rief eine Ausschwemmung zahlreicher Blasten in das periphere Blut hervor. Diese Ausschwemmung konnte bei der Gruppe D durch gleichzeitige Injektion von Dexamethason verhindert werden.

5.2 Milztupfpräparate

Von jedem Versuchstier wurden im Milztupfpräparat 500 Lymphozyten nach ihrer Aktivität der alkalischen Phosphatase in 6 Reaktionsklassen eingestuft und für jedes Tier der Phosphatase-Index berechnet.

Gruppe A

Tabelle 11

prozentuale Verteilung der Lymphozyten im Milztupfpräparat nach ihrer Aktivität der alkalischen Phosphatase

Tier, Nr.	Reaktionsklasse						Phosphatase-Index
	0	1	2	3	4	5	
1	98,2	0,2	1,2	0,4	0,0	0,0	3,8
2	94,4	0,0	3,8	1,6	0,2	0,0	12,6
3	92,6	0,4	3,6	2,8	0,6	0,0	18,4
4	87,8	0,8	4,4	5,6	1,4	0,0	32,0
5	91,4	1,6	2,8	3,6	0,6	0,0	20,4

Gruppe B

Tabelle 12

prozentuale Verteilung der Lymphozyten im Milztupfpräparat nach ihrer Aktivität der alkalischen Phosphatase

Tier, Nr.	Reaktionsklasse						Phosphatase-Index
	0	1	2	3	4	5	
6	87,8	0,4	4,0	7,2	0,6	0,0	32,4
7	85,2	0,8	2,6	7,8	3,6	0,0	43,8
8	82,6	1,6	7,6	5,8	2,4	0,0	43,8
9	78,6	1,8	5,2	8,0	6,4	0,0	61,8
10	86,4	1,4	3,2	7,0	2,0	0,0	36,8

Gruppe C

Tabelle 13

prozentuale Verteilung der Lymphozyten im Milztupfpräparat nach ihrer Aktivität der alkalischen Phosphatase

Tier, Nr.	Reaktionsklasse						Phosphatase-Index
	0	1	2	3	4	5	
11	71,8	2,6	10,2	14,2	1,2	0,0	70,4
12	76,2	3,8	5,2	11,4	3,4	0,0	62,0
13	78,8	2,4	9,4	7,8	1,6	0,0	51,0
14	80,4	0,6	9,4	8,0	1,6	0,0	49,8
15	79,6	2,0	8,2	7,2	3,0	0,0	52,0

Gruppe D

Tabelle 14

prozentuale Verteilung der Lymphozyten im Milztupfpräparat nach ihrer Aktivität der alkalischen Phosphatase

Tier, Nr.	Reaktionsklasse						Phosphatase-Index
	0	1	2	3	4	5	
18	92,2	0,4	3,0	4,2	0,2	0,0	19,8
19	87,8	0,6	5,6	4,0	2,0	0,0	31,8
20	95,6	1,2	0,4	2,2	0,6	0,0	11,0
21	97,6	0,0	0,4	2,0	0,0	0,0	6,8
22	93,8	2,0	1,4	2,8	0,0	0,0	13,2
24	91,4	0,8	4,8	1,6	1,4	0,0	20,8
25	95,0	0,4	1,0	1,8	0,0	0,0	7,8

Um zu entscheiden, welcher Anteil der Streuung der Phosphatase-Indices auf Unterschiede zwischen den vier Gruppen oder auf Zufall zurückzuführen ist, wurde eine einfache Varianzanalyse durchgeführt.

Bei der Varianzanalyse werden die Mittelwerte der zu prüfenden Gruppen miteinander verglichen. Die Varianzanalyse beruht auf einer rein arithmetischen Zerlegung der Quadratsumme (= Summe der Quadrate der Abweichungen der Stichprobenwerte vom Mittelwert), und zwar zerlegt man in eine Summe von Bestandteilen, von denen jeder einer bestimmten Variationsursache entspricht.

einfache Varianzanalyse der Phosphatase-Indices

Gruppe A

Tier, Nr.	Phosphatase-Index
1	3,8000
2	12,6000
3	18,4000
4	32,0000
5	20,4000
$\bar{x}$	17,4400

Gruppe B

Tier, Nr.	Phosphatase-Index
6	32,4000
7	43,8000
8	43,8000
9	61,8000
10	36,8000
$\bar{x}$	43,7200

Gruppe C

Tier, Nr.	Phosphatase-Index
11	70,4000
12	62,0000
13	51,0000
14	49,8000
15	52,0000
$\bar{x}$	57,0400

Gruppe D

Tier, Nr.	Phosphatase-Index
18	19,8000
19	31,8000
20	11,0000
21	6,8000
22	13,2000
24	20,8000
25	7,8000

$\bar{x}$ 15,8142

$\bar{x}$ 31,8954

	SAQ	f	MAQ	F-Wert
zw. Gr.	6715,3689	3	2238,4563	23,4322
in. Gr.	1719,5205	18	95,5289	
Summe	8434,8895	21		

$F(3, 18) = 3,16$ (für eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5 %)

multiple Vergleiche

Mittelwerts= vergleiche	Differenz	Kofidenzintervall	Signifikanz
A - B	26,2800	19,0327	+
A - C	39,6000	19,0327	+
A - D	1,6257	17,6209	
B - C	13,3200	19,0327	
B - D	27,9057	17,6209	+
C - D	41,2257	17,6209	+

Zusammenfassung

Bereits in den Milztupfpräparaten der unbehandelten Kontrolltiere der Gruppe A fanden sich regelmäßig lymphatische Rundzellen, die Phosphatase-Aktivität erkennen ließen (s. Abb. 1). Fast ausschließlich handelte es sich dabei um große Lymphozyten (s. Abb. 2 und 3) und nur sehr wenige kleine Lymphozyten (s. Abb. 4).

Wie die multiplen Vergleiche bei der durchgeführten Varianzanalyse beweisen, trat bei den Mäusen der Gruppen B und C 48 Stunden nach PHA-P-Injektion eine auf dem 5 %-Niveau signifikante Steigerung der Phosphatase-Indices im Milztupfpräparat gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe A auf.

Ein Milztupfpräparat der Gruppe B zeigt die Abb. 5.

Ein signifikanter Unterschied der Phosphatase-Indices zwischen den Kontrolltieren und den Mäusen der Gruppe D, die PHA-P und Dexamethason gleichzeitig erhalten hatten, bestand nicht, ebensowenig ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen B und C untereinander.

Abbildungen zu den Milztupfpräparaten



Abb. 1

Ausschnitt aus einem Milztupfpräparat der Gruppe A. Es ist nur eine lymphatische Zelle mit Phosphatase-Aktivität zu erkennen (Pfeil).

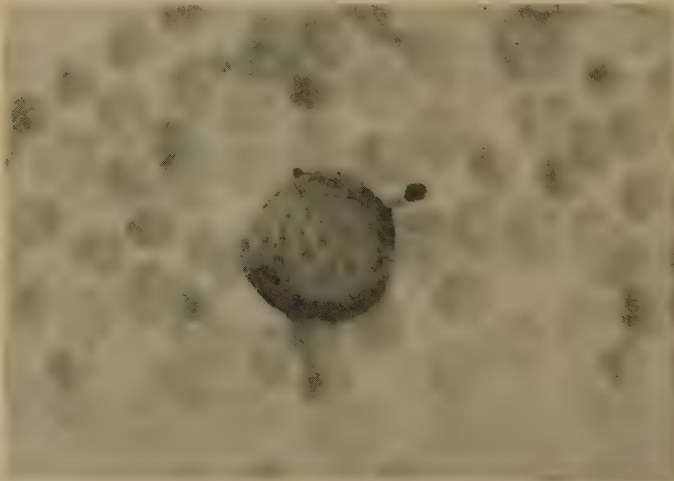


Abb. 2

Großer Lymphozyt mit diffus verteilten, meist granulären Farbstoffablagerungen (Reaktionsklasse 3).

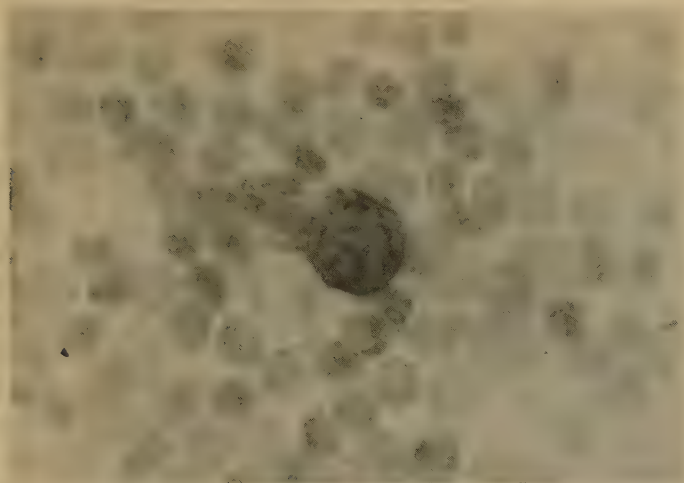


Abb. 3

Großer Lymphozyt, die Reaktion ist stärker als bei der Zelle in Abb. 2. Schwarze, unregelmäßig verteilte Farbstoffplaques (Reaktionsklasse 4).

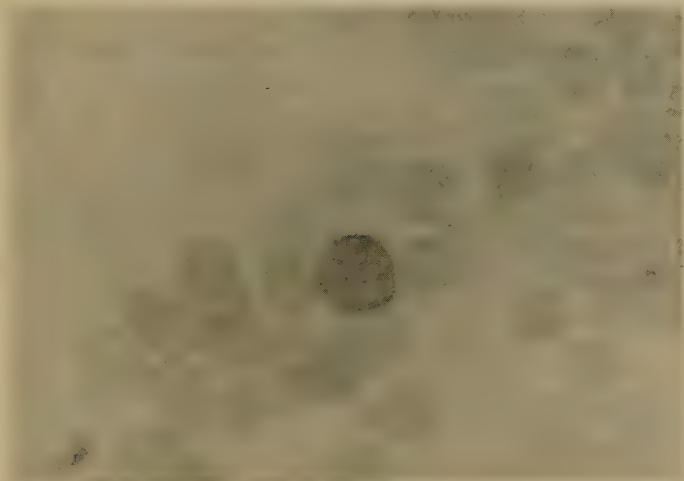


Abb. 4

Kleiner Lymphozyt, im schmalen Zytoplasmasaum sind inhomogene, meist granuläre Farbniederschläge zu erkennen (Reaktionsklasse 2).

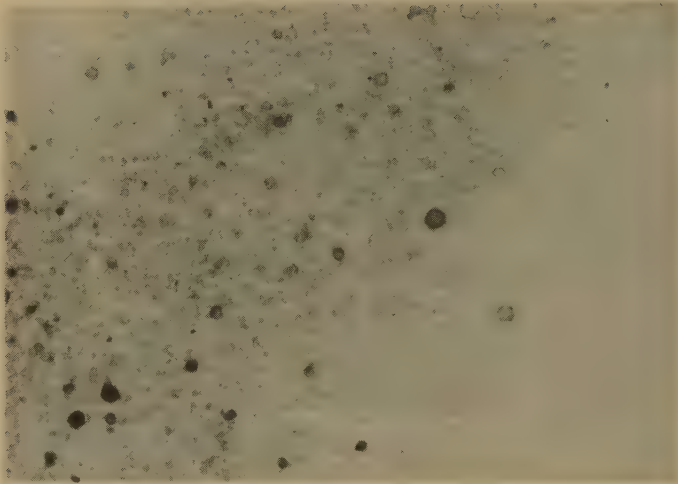


Abb. 5

Ausschnitt aus einem Milztupfpräparat der Gruppe B.
Im Gegensatz zur Abb. 1, wo nur ein einziger positiver
Lymphozyt zu sehen ist, finden sich hier zahlreiche
lymphatische Rundzellen mit alkalischer Phosphatase-
Aktivität.

5.3 Milzgefrierschnitte

Gruppe A

Bei allen 5 Tieren zeigten die Gefäßendothelzellen kräftige Aktivität von alkalischer Phosphatase. In den Follikelrandzonen fanden sich regelmäßig Lymphozyten mit Phosphatase-Aktivität, an den Sinus jedoch nicht.

- Maus Nr. 1: Vereinzelte, in der Follikelrandzone verstreut liegende Lymphozyten mit alkalischer Phosphatase-Aktivität.
- Maus Nr. 2: In der Follikelrandzone liegender, geschlossener Ring positiver Lymphozyten, der eine durchschnittliche Breite von 20 μ hat.
- Maus Nr. 3: Ebenfalls geschlossener Ring positiver Lymphozyten mit einer Breite von etwa 20 μ .
- Maus Nr. 4: Peripher liegender Ring positiver Lymphozyten mit einer Breite von ungefähr 40 μ .
- Maus Nr. 5: Auch hier geschlossener Ring positiver Lymphozyten in der Follikelrandzone mit einer durchschnittlichen Breite von etwa 30 μ .

Gruppe B

Auch bei dieser Gruppe enthielten die Gefäßendothelzellen starke Aktivität alkalischer Phosphatase.

- Maus Nr. 6: Peripher in den Follikelrandzonen liegende Lymphozyten mit Phosphatase-Aktivität. Diese Zellen bilden dort Ringe von durchschnittlich 50 μ Breite, die aber an einigen Stellen nicht ganz geschlossen sind. In den hellen Zonen der Follikel lassen sich keine Lymphozyten mit Phosphatase-Aktivität nachweisen, an den Sinus liegen vereinzelt positive Lymphozyten.
- Maus Nr. 7: Ringe von positiven Lymphozyten in den Follikelrandzonen mit einer durchschnittlichen Breite von 50 μ . Die Ringe sind an einigen Stellen nicht geschlossen. In den hellen Zonen liegen einzelne positive Lymphozyten, an den Sinus jedoch nicht.
- Maus Nr. 8: Ringe von positiven Lymphozyten in den Follikelrandzonen mit einer Breite von etwa 60 μ . Nur sehr wenige positive Lymphozyten in den hellen Zonen und keine an den Sinus.
- Maus Nr. 9: Periphere Ringe von positiven Lymphozyten. Die Ringe sind etwa 70 μ breit und rundum geschlossen. In den hellen Zonen und an den Sinus einige wenige positive Lymphozyten.

Maus Nr. 10: Peripher liegende Ringe in den Follikelrandzonen mit einer Breite von etwa 50 μ . Die Kontinuität der Ringe wird an einigen Stellen durch Gruppen von Lymphozyten unterbrochen, die keine Aktivität erkennen lassen.

Gruppe C

Wie bei den ersten beiden Gruppen starke Reaktion der Gefäßendothelzellen.

Maus Nr. 11: Peripher in den Follikelrandzonen liegende Ringe mit einer Breite von etwa 110 μ . Die dort liegenden Lymphozyten weisen hohe Aktivität von alkalischer Phosphatase auf, während die wenigen positiven Lymphozyten in den hellen Zonen nur schwache Reaktion zeigen. An den Sinus sind keine positiven Lymphozyten nachweisbar.

Maus Nr. 12: Peripher liegende Ringe von etwa 90 - 100 μ Breite. In den hellen Zonen sind keine positiven Zellen vorhanden, an den Sinus nur vereinzelt.

Maus Nr. 13: Geschlossene Ringe aus positiven Lymphozyten in den Follikelrandzonen von etwa 70 μ Breite. Die dort liegenden Lymphozyten enthalten durchweg kräftige Aktivität von alkalischer Phosphatase. In den

hellen Zonen und an den Sinus nur wenige positive Lymphozyten mit schwacher Aktivität.

- Maus Nr. 14: Periphere Ringe positiver Lymphozyten mit einer Breite von 70 - 80 μ . In den hellen Zonen und an den Sinus nur ganz vereinzelt positive Lymphozyten.
- Maus Nr. 15: Ringe in den Follikelrandzonen von etwa 80 μ Breite. Wenige positive Lymphozyten in den hellen Zonen und an den Sinus.

Gruppe D

Auch bei dieser Gruppe kräftige Aktivität alkalischer Phosphatase in den Gefäßendothelzellen.

- Maus Nr. 18: Alkalische Phosphatase-Aktivität in Lymphozyten, die peripher einen Saum von etwa 30 μ Breite in den Follikelrandzonen bilden. Stellenweise liegen die positiven Lymphozyten in dichten Haufen zusammen, an anderen Stellen werden die Ringe von Lymphozytengruppen durchbrochen, die keine Reaktion zeigen. In den hellen Zonen liegen wenige positive Lymphozyten, an den Sinus nur solche, die keine alkalische Phosphatase-Aktivität besitzen.
- Maus Nr. 19: Wie bei Maus Nr. 18, jedoch erreichen die Ringe eine Breite von 50 μ .

- Maus Nr. 20: Die Ringe aus Lymphozyten mit alkalischer Phosphatase-Aktivität in den Follikelrandzonen sind an vielen Stellen unterbrochen, sie bestehen aus höchstens 2 - 3 Zellschichten. In den hellen Zonen und an den Sinus liegen keine positiven Lymphozyten.
- Maus Nr. 21: In den Follikelrandzonen finden sich vereinzelt Lymphozyten mit alkalischer Phosphatase-Aktivität, eine Ringbildung ist nur angedeutet erkennbar. In den hellen Zonen und an den Sinus kommen keine positiven Lymphozyten vor.
- Maus Nr. 22: Peripher liegende, lückenhafte Ringe aus positiven Lymphozyten mit einer Breite bis zu etwa 40 μ . In den hellen Zonen finden sich wenige positive Lymphozyten, an den Sinus jedoch nicht.
- Maus Nr. 24: Gleicher Befund wie bei Maus Nr. 22.
- Maus Nr. 25: Nur andeutungsweise erkennbare Ringbildung durch vereinzelt positive Lymphozyten in den Follikelrandzonen, in den hellen Zonen und an den Sinus sind keine Lymphozyten mit alkalischer Phosphatase-Aktivität zu beobachten.

Zusammenfassung

Bei allen vier untersuchten Gruppen von Albinomäusen waren in den Follikelrandzonen lymphatische Rundzellen zu erkennen, die alkalische Phosphatase-Aktivität enthielten.

Bei der Gruppe A bildeten diese Zellen rund um die Milzfollikel verlaufende Ringe, die eine Breite bis zu 30 μ erreichten.

48 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 0,1 ml PHA-P-Lösung ließen sich in den Milzgefrierschnitten der Gruppe B gleichartige Ringe nachweisen, die aber eine Breite von 50 - 70 μ aufwiesen.

Bei der Gruppe C waren diese Ringe 48 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 0,2 ml PHA-P-Lösung sogar 70 - 110 μ breit.

In der Gruppe D hatten die Ringe 48 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 0,2 ml PHA-P-Lösung und subkutaner Injektion von 0,4 mg Dexamethason nur noch eine Breite von maximal 50 μ .

Während bei den Tieren der Gruppe A in den hellen Zonen und an den Sinus keine positiven Lymphozyten zu finden waren, konnten diese bei den meisten Tieren der Gruppen B und C dort nachgewiesen werden.

Bei den Tieren der Gruppe D kamen nur einzelne positive Lymphozyten in den hellen Zonen vor, nicht aber an den Sinus.

5.4 Milzparaffinschnitte

Gruppe A

In den Paraffinschnitten dieser Gruppe ließen sich relativ viele Megakaryozyten beobachten, etwa einer auf 1000 Zellen, wobei die reifen Formen weitaus am zahlreichsten vertreten waren.

An den Sinus lagen verstreut Erythropoesenester. Die Follikel waren alle etwa gleich groß und hatten meist keine Reaktionszentren.

Gruppe B

Bei diesen Präparaten konnte eine starke Zunahme der Megakaryozyten gesehen werden. Etwa jede 400. Zelle war ein Megakaryozyt, die jugendlichen Formen waren aber jetzt in der Überzahl.

Außerdem hatte die Zahl der Erythropoesenester an den Sinus zugenommen. Sie bestanden überwiegend aus Normoblasten.

Die Follikel waren jetzt etwas größer als die der Gruppe A, die meisten besaßen ein Reaktionszentrum.

Gruppe C

Bei dieser Gruppe wurde eine weitere Zunahme der Megakaryozyten gegenüber der Gruppe B beobachtet. Jede 320. Zelle war ein Megakaryozyt, die unreifen Formen domi-

nierten dabei. An den Sinus waren die Erythropoese=nester noch zahlreicher als bei der Gruppe B, auch hier bestanden sie vorwiegend aus Normoblasten.

Die Follikel hatten etwa die gleiche Größe wie die der Gruppe B und die meisten verfügten über ein Reaktions=zentrum.

Gruppe D

Die Zahl der Megakaryozyten war zwar kleiner als bei den beiden PHA-P-Gruppen, aber noch wesentlich größer als bei der Gruppe A. Jetzt war etwa jede 500. Zelle ein Megakaryozyt, die reifen Formen herrschten vor, Plättchenbildung war aber nur in geringem Umfang zu beobachten.

Die Zahl der Erythropoesenester entsprach etwa der bei den Gruppen B und C, auch hier wurden vorwiegend Normoblasten gefunden.

Auffallend war das Auftreten vieler kleiner Follikel, die wie die ebenfalls vorkommenden großen Follikel meist keine Reaktionszentren enthielten.

6. Diskussion

Es wurde untersucht, ob die von KAPLOW beschriebenen Lymphozyten mit alkalischer Phosphatase-Aktivität im peripheren Blut von Albinomäusen funktionell eine Einheit bilden und woher sie stammen.

Schon bei der Untersuchung der Milzen der unbehandelten Kontrolltiere fanden sich in den Follikelrandzonen verstreut Zellen mit alkalischer Phosphatase-Aktivität, wie dies bereits früher von LÖFFLER (11) beschrieben wurde.

Da bei den untersuchten Mäusen weder Granulozyten noch Monozyten im peripheren Blut alkalische Phosphatase-Aktivität erkennen ließen, muß es sich bei den positiven Zellen der Follikelrandzonen um lymphatische Zellen handeln. Es liegt daher der Schluß nahe, daß die im peripheren Blut nachgewiesenen Lymphozyten mit Phosphatase-Aktivität zumindest zum Teil aus den Follikelrandzonen der Milz stammen müssen.

In den Milztupfpräparaten waren die Zellen mit Phosphatase-Aktivität auch eindeutig zu definieren. Es handelte sich bei allen vier Gruppen zum überwiegenden Teil um große Lymphozyten, einige Blasten und sehr wenige kleine Lymphozyten.

Um das funktionelle Verhalten der lymphatischen Rundzellen mit Phosphatase-Aktivität zu analysieren, wurde einem Teil der Mäuse PHA-P-Lösung intraperitoneal verabreicht. Damit wurde eine Stimulation des lymphatischen Gewebes erreicht, die sehr einfach durch das Auftreten von Blasten im peripheren Blut kontrolliert werden konnte.

Eine Gruppe von 5 Mäusen erhielt je 0,1 ml PHA-P-Lösung intraperitoneal, eine weitere Gruppe von ebenfalls 5 Mäusen je 0,2 ml PHA-P-Lösung. Die für die Milztupfpräparate errechneten Phosphatase-Indices der lymphatischen Rundzellen lagen statistisch signifikant höher (5%-Niveau) als die der Kontrolltiere, die 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal erhalten hatten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden PHA-P-Gruppen bestand nicht.

Eine weitere Gruppe von 7 Mäusen erhielt gleichzeitig je 0,2 ml PHA-P-Lösung intraperitoneal und 0,4 mg Dexamethason subkutan. Dadurch ließ sich eine Stimulation des lymphatischen Gewebes unterdrücken. Zwischen den Phosphatase-Indices dieser Gruppe und denen der Kontrolltiere bestand kein signifikanter Unterschied.

Diese anhand der Milztupfpräparate gewonnenen Ergebnisse ließen sich in den Milzgefrierschnitten bestätigen.

Aus der vorliegenden Untersuchung geht hervor, daß die Lymphozyten mit alkalischer Phosphatase-Aktivität der Albinomaus an immunologischen Reaktionen beteiligt sein dürften. Es erscheint somit möglich, einen Teil der immunologisch aktiven Zellen der Albinomaus durch den zytochemischen Nachweis der alkalischen Phosphatase zu markieren.

7. Zusammenfassung

Aus 22 jungen, männlichen Albinomäusen wurden vier Versuchsgruppen gebildet, denen folgende Substanzen appliziert wurden:

- Gruppe A (5 Tiere) je 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal
Gruppe B (5 Tiere) je 0,1 ml PHA-P-Lösung (Bacto-Phytohemagglutinin-P) intraperitoneal
Gruppe C (5 Tiere) je 0,2 ml PHA-P-Lösung intraperitoneal
Gruppe D (7 Tiere) je 0,2 ml PHA-P-Lösung intraperitoneal und gleichzeitig 0,4 mg Dexamethason (Fortecortin^R) subkutan

Die Wirksamkeit der PHA-P-Lösung wurde im Blutaussstrich am Auftreten von Blasten der lymphatischen Reihe kontrolliert. In den Ausstrichen der Gruppen A und D fanden sich nur ganz vereinzelt Blasten, in den Ausstrichen der beiden PHA-P-Gruppen dagegen sehr viele.

48 Stunden nach den Injektionen wurden die Mäuse getötet und Milztupfpräparate hergestellt, in denen zytochemisch nach der Methode von MERKER und HEILMEYER alkalische Phosphatase in lymphatischen Rundzellen nachgewiesen wurde. Analog zu dem von BRODELL und SWISHER eingeführten Phosphatase-Index für neutrophile Granulozyten wurden in dieser Untersuchung Phosphatase-Indices für lymphatische Rundzellen für jedes Milztupfpräparat errechnet. Dabei lagen die Phosphatase-Indices in den beiden PHA-P-Gruppen signifikant (5%-Niveau) höher als bei den beiden anderen Gruppen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen A und D bestand nicht.

In den Milzgefrierschnitten fanden sich die lymphatischen Rundzellen mit Phosphatase-Aktivität in den Follikelrandzonen. Bei den PHA-P-Gruppen waren diese Zellen aber weitaus zahlreicher und dichter gelagert als bei der Kontrollgruppe A und der Gruppe D.

Intraperitoneale Zufuhr von PHA-P-Lösung, als Modell einer Antigeneinschwemmung, führte bei den untersuchten Albinomäusen zu einer vermehrten Bildung von lymphatischen Rundzellen mit alkalischer Phosphatase-Aktivität in den Follikelrandzonen der Milz.

Diese Reaktion unterblieb bei den Mäusen, die gleichzeitig mit der PHA-P-Lösung Dexamethason erhalten hatten.

Somit ist es möglich, einen Teil der immunologisch aktiven Zellen der Albinomaus durch den zytochemischen Nachweis der alkalischen Phosphatase zu markieren.

8. Literaturangaben

1. Daniels, J.C., S.E. Ritzmann, and W.C. Levin
Lymphocytes: morphological, developmental, and functional characteristics in health, disease, and experiment.
An analytic review.
Tex. Rep. Biol. Med. 26, 5 - 92 (1968)
2. Everett, N.B., R.W. Caffrey, and W.O. Riche
Recirculation of lymphocytes
Ann. N.Y. Acad. Sci. 113, 887 (1964)
3. Grundmann, E.
Der morphologische Nachweis von zwei Lymphozytensystemen beim Menschen.
Klin. Wschr. 37, 941 (1959)
4. Lennert, K.
Lymphknoten. Diagnostik in Schnitt und Ausstrich
A. Cytologie und Lymphadenitis
In: Handb. der speziellen path. Anat. und Histol.
(Henke, Iubarsch, Roessle und Mehlinger)
Bd. I, 3, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1961
5. Kaplow, L.S.
Alkaline phosphatase activity in peripheral blood lymphocytes
Arch. Path. 88, 69 - 72 (1969)
6. Fischer, R. und H.E. Schaefer
Artspezifische Unterschiede der alkalischen Phosphatase in Blutzellen verschiedener Muridenarten
In: Erythropoese, unreifzellige Leukämie, lymphozytöses System und immunpathologische Reaktionen
S. 232 - 235
Hrsg. Hempel, H. und L. Heilmeyer
J.F. Lehmann, München, 1969

7. Hullinger, L. and A.A. Blaskovec
A simple and efficient method of separating peripheral blood leukocytes for in-vitro studies
Lancet, 1967/I, 1304 - 1305
8. Naspitz, C.K. and M. Richter
The metabolism of phytohemagglutinin during incubation with human peripheral lymphocytes
Brit. J. Haemat. 15, 77 - 85 (1968)
9. Merker, H. und L. Heilmeyer
Die alkalische Phosphatase neutrophiler Leukozyten
Dtsch. Med. Wschr. 85, 253 (1960)
10. Brodell, H. and S.N. Swisher
Studies of leukocyte alkaline phosphatase determined by a clinically applicable histochemical method
Clin. Res. Proc. 2, 58 (1954)
11. Löffler, H.
Vergleichende histochemische Untersuchungen an Säugermilzen
Verh. Dtsch. Ges. Path. 44. Tgg. S. 351 - 355
G. Fischer Verlag, Stuttgart, 1960

Lebenslauf

Ich wurde am 17.7.1944 in Hermannstein, Kreis Wetzlar geboren. Nach vier Jahren Volksschule besuchte ich das Goethe-Gymnasium in Wetzlar, wo ich im Februar 1964 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommersemester 1964 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Justus Liebig-Universität in Gießen. Nach elf Semestern legte ich im Februar 1970 das medizinische Staatsexamen ab.

Die Medizinalassistentenzeit absolvierte ich anschließend in der Medizinischen und in der Chirurgischen Universitätsklinik in Gießen. Danach führte ich fünf Monate Praxisvertretungen durch und trat im August 1971 als Assistenzarzt in das Psychiatrische Landeskrankenhaus in Gießen ein.

